

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
17. Mai 2001 (17.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/34640 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: C07K 14/00

(71) Anmelder und

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/11020

(72) Erfinder: KIRCHHOFF, Frank [DE/DE]; Schlossgarten  
4, 91054 Erlangen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
8. November 2000 (08.11.2000)

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜNCH, Jan  
[DE/DE]; Schlossgarten 4, 91054 Erlangen (DE).  
STÄNDKER, Ludger [DE/DE]; Dohmeyers Weg 25,  
30625 Hannover (DE). FORSMANN, Wolf-Georg IPF  
PharmaCeuticals GmbH [DE/DE]; Feodor-Lynen-Str.  
31, 30625 Hannover (DE). ADERMANN, Knut IPF  
PharmaCeuticals GmbH [DE/DE]; Feodor-Lynen-Str.  
31, 30625 Hannover (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 53 732.1 8. November 1999 (08.11.1999) DE  
100 23 665.0 16. Mai 2000 (16.05.2000) DE

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22  
41, 50462 Köln (DE).

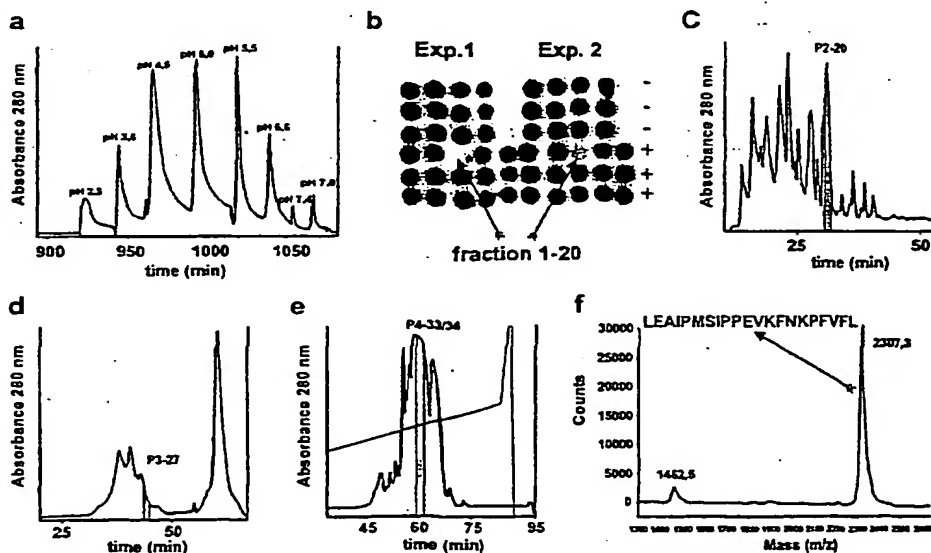
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): IPF PHARMACEUTICALS GMBH [DE/DE];  
Feodor-Lynen-Str. 31, 30625 Hannover (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PEPTIDE (VIRIP) WHICH INHIBITS A CIRCULATING VIRUS IN HUMANS AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: HUMANES ZIRKULIERENDES VIRUS INHIBIERENDES PEPTID (VIRIP) UND SEINE VERWENDUNG



(57) Abstract: The invention relates to a peptide with the following amino acid sequence: Z<sub>1</sub>-LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF-Z<sub>2</sub> (VIRIP), in addition to its biologically active fragments and/or variants and/or derivatives, in particular, amidated; acetylated, sulphated, polyethylene glycol (PEG) modified, phosphorylated and/or glycosylated derivatives and to peptides which can be prepared by multiple synthesis and which have the biological activity of VIRIP. In said sequence, Z<sub>1</sub> and Z<sub>2</sub> represent independently of one another a number of amino acid esters between 0 and 10 and if Z<sub>1</sub> or Z<sub>2</sub>=0 amino acid esters, then Z<sub>1</sub>=H and/or Z<sub>2</sub>=COOH.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/34640 A2



CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Peptid mit nachfolgender Aminosäuresequenz: Z<sub>1</sub>-LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF-Z<sub>2</sub> (VIRIP), sowie seine biologisch aktiven Fragmente und/oder Varianten und/oder Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, Polyethylenglycol (PEG) modifizierte, phosphorylierte und/oder glykosylierte Derivate, sowie die durch multiple Synthese darstellbaren Peptide, welche die biologische Aktivität von VIRIP besitzen, darin repräsentieren Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub> unabhängig voneinander eine Anzahl von 0 bis zu 10 Aminosäureresten, und falls Z<sub>1</sub> oder Z<sub>2</sub>=0 Aminosäurereste bedeuten, dann Z<sub>1</sub>=H und/oder Z<sub>2</sub>=COOH.

## **Humanes zirkulierendes Virus inhibierendes Peptid (VIRIP) und seine Verwendung**

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid (Eiweißstoff) mit inhibierenden Eigenschaften auf die virale Infektion von Zellen: Humanes Virus inhibierendes Peptid (VIRIP) und seine therapeutische und diagnostische Verwendung. Die Erfindung umfasst die natürlich vorkommende Form des VIRIP sowie abgeleitete Fragmente und/oder Analoga bzw. Derivate sowie schließlich ein Arzneimittel enthaltend die natürlichen, rekombinanten und synthetischen Peptide zur Verwendung für medizinische Indikationen und zur Verwendung als ein Diagnosemittel. Die Erfindung umfasst darüber hinaus modifizierte Formen des VIRIP, die eine besonders günstige therapeutische Wirksamkeit aufweisen. Des weiteren eine Nukleinsäuresonde hybridisierend für VIRIP oder eines seiner Fragmente und/oder Derivate und Antikörper bzw. Antagonisten gerichtet gegen VIRIP oder eines seiner Fragmente und/oder Derivate zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken, insbesondere bei viralen Erkrankungen und zur Behandlung von Infektionen mit HIV-1 und HIV-2.

Die VIRIP konnte überraschenderweise mit Hilfe von chromatographischen Methoden und mit Hilfe eines biologischen Assays aus humanem Hämofiltrat isoliert werden. Die biochemische Charakterisierung des erfindungsgemäßen Peptids erfolgte durch Massenspektrometrie und vollständigen Sequenzierung aller Aminosäuren.

Das Peptid besitzt die folgende Aminosäuresequenz:

$Z_1$  - LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF -  $Z_2$ , worin  $Z_1$ ,  $Z_2$  unabhängig voneinander eine Anzahl von 0 bis zu 10 Aminosäureresten, und falls  $Z_1$  oder  $Z_2=0$  Aminosäurereste bedeutet, dann  $Z_1=H$  und/oder  $Z_2=COOH$  repräsentieren.

Die Molekularmasse des erfindungsgemäßen Peptids VIRIP beträgt 2303 Da, wenn  $Z_1$  und  $Z_2$  keine Aminosäurereste bedeuten.

Als Derivate des VIRIP sind insbesondere amidierter, acetylierter, sulfatierter, Polyethylenglycol (PEG) modifizierter, phosphorylierter und/oder glykosylierter Derivate, sowie die durch multiple Synthese darstellbaren Peptide, welche die biologische Aktivität von VIRIP besitzen, zu nennen.

Das erfindungsgemäße Peptid umfasst ein 20 Aminosäuren umfassendes Fragment des bekannten humanen Proteins Alpha-1-Antitrypsin (Accession No. P01009), welches in seiner prozessierten Form aus 394 Aminosäuren besteht. Die Funktion des Alpha-1-Antitrypsin wird vornehmlich als Hemmstoff für die Enzyme Elastase sowie Thrombin und Plasmin beschrieben. Die erfindungsgemäße Peptidsequenz des VIRIP beginnt vorzugsweise hinter der Aminosäure 352 des Alpha-1-Antitrypsin und umfasst somit die Aminosäuren 353 bis 372 des Alpha-1-Antitrypsin.

Überraschenderweise bewirkt das erfindungsgemäße Peptid eine Unterdrückung der HIV-1-Infektion und/oder -Replikation von bzw. in humanen Blutzellen.

Das erfindungsgemäße Peptid ist durch ein Reinigungsverfahren ausgehend von humanem Hämofiltrat erhältlich. Dieses Hämofiltrat fällt bei der Ultrafiltration des Blutes von Nierenkranken in großen Mengen an.

Gegenstand der Erfindung sind auch Polynukleotide, die für das erfindungsgemäße Peptid kodieren, wobei diese Polynukleotide bevorzugt aus DNA-RNA genomischer DNA oder PNA aufgebaut sind. Ein weiterer Aspekt der Erfindung

sind Vektoren, die die erfindungsgemäßen Polynukleotide enthalten sowie gentechnisch manipulierte Wirtszellen, die den erfindungsgemäßen Vektor enthalten. Auch Polynukleotide, die mit den erfindungsgemäßen Polynukleotiden hybridisieren (Antisense-Nukleotide) sind Gegenstand der Erfindung. Weitere Aspekte der Erfindung sind Antikörper, die gegen die erfindungsgemäßen Peptide gerichtet sind sowie Antagonisten und Inhibitoren, die die Wirkung der erfindungsgemäßen Peptide hemmen.

Das erfindungsgemäße Peptid kann auch mit einem Adapterprotein gekoppelt sein, das die Aufnahme in virusinfizierbare Zellen gewährleistet.

Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zur Behandlung von Patienten, die VIRIP benötigen durch Gabe therapeutischer Mengen der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie Verfahren zur Behandlung von Patienten, die eine Inhibition des VIRIP benötigen durch Gabe therapeutischer Mengen eines Antagonisten/Inhibitors.

Alternativ kann die therapeutische Wirkung des erfindungsgemäßen Polypeptides durch Gabe von Polynukleotiden kodierend für VIRIP und anschließende Expression in vivo beim Patienten erreicht werden.

Das humane Hämofiltrat wird gegebenenfalls mit Wasser verdünnt und angesäuert. Der pH-Wert beträgt vorzugsweise 1,5 bis 3,5, insbesondere 2,5 bis 3,0. Danach wird das Hämofiltrat über einen Kationenaustauscher geleitet, beispielsweise einem mit Sulfonsäuregruppen modifizierenden Trägermaterial (Fraktogel SP - 650 (M), Merck, Darmstadt). Die an den Kationenaustauscher gebundenen Peptide werden mit einer relativ hoch konzentrierten Salzlösung eluiert. Die Ionenstärke der Elutionslösung entspricht dabei ungefähr einer 0,5 bis 1 molaren Ammoniumacetatlösung.

Das aufgefangene Eluat wird einer weiteren Kationenaustauscher-Chromatographie unterzogen. Diese Chromatographie ist vorzugsweise eine Stufenelution mit Puffern von ansteigenden pH-Werten.

Die das erfindungsgemäße Peptid enthaltenen Fraktionen werden mittels präparativer Umkehrphasen-Chromatographie und nachfolgender semipräparativer Umkehrphasen-Chromatographie beispielsweise an mit C18 modifizierten Trägermaterialien weitergereinigt. Der Aufreinigungsgrad wird vorzugsweise mittels analytischer Umkehrphasen-Chromatographie beispielsweise an mit C18 modifizierten Trägermaterialien überprüft.

Die durch die chromatographische Reinigung erhaltene Substanz wurde der Strukturaufklärung zugeführt. Die Bestimmung der Molekülmassen des gereinigten Peptids erfolgte mittels eines Elektrospray Massenspektrometers (ESI-MS). Die Sequenzanalyse des nativen Peptids erfolgte über einen Edman-Abbau mit einem ABI 473 A Sequenzer. Die erfindungsgemäße Peptidsequenz wurde chemisch synthetisiert und die Struktur des synthetisch hergestellten Peptids wurde ebenfalls aufgeklärt. Dieses synthetisch hergestellte VIRIP bewirkt ebenfalls eine dosis-abhängige Unterdrückung der HIV-1-Infektion und/oder -Replikation von bzw. in humanen Blutzellen.

Das erfindungsgemäße Peptid sowie seine cDNA, sein Gen und Analoga, Fragmente und Derivate zu dem Peptid, der cDNA und dem Gen sowie Antikörper, welche die Wirkung des VIRIP aufheben, können als Arzneimittel Verwendung finden. Seine biologische Aktivität entspricht der virus-inhibierender Substanzen. Dabei kann vermutet werden, dass VIRIP aufgrund seiner kurzen, hydrophoben Sequenz in die Blutzellen aufgenommen wird und dort als Hemmstoff von Virus-Enzymen oder als Hemmstoff von Enzymen der Blutzellen wirkt oder dass VIRIP an Rezeptoren bindet, welche für den Eintritt von Viren von Bedeutung sind. Somit verhindert VIRIP die Infektion von Zellen mit dem Virus.

Das erfindungsgemäße Peptid kann dabei in für Peptide üblicher Weise parental, intravenös, intramuskulär, intranasal, lokal-topisch, subkutan oder bukal verabreicht werden. Die Menge an zu verabreichendem Peptid beträgt 1 mg bis 1 g pro Darreichungseinheit pro Tag. Die Wirkung des erfindungsgemäßen

Peptids kann durch Gabe geeigneter Inhibitoren/Antagonisten gehemmt werden.

Das erfindungsgemäße Diagnostikmittel enthält poly- oder monoklonale Antikörper gegen das erfindungsgemäße Peptid gegebenenfalls in fluoreszenz- oder radioaktiv-markierter Form, um in einem an sich bekannten ELISA oder RIA eingesetzt zu werden. Die Antikörper gegen ein erfindungsgemäßes Peptid können durch Immunisierung von Säugetieren erhalten werden. Das erfindungsgemäße Diagnostikmittel enthält DNA, RNA und/oder PNA gegebenenfalls in modifizierter und/oder markierter Form zum Einsatz in dem Fachmann bekannten Testsystemen wie PCR oder Fingerprinting.

Figur 1: Aufreinigung von VIRIP. Die Aufreinigungsschritte sind im Text beschrieben. (b) Inhibition der Replikation von HIV-1 NL43 in humanen Blutlymphozyten durch die Fraktion 1-20. Die Zellen wurden 2 Tage mit PHA stimuliert, mit Virusstocks die 10 ng p24 enthalten infiziert und die Reverse Transkriptase-Aktivität im Kulturüberstand 9 Tage nach Infektion bestimmt. Dargestellt ist das Ergebnis der Infektionsexperimente.

Figur 2: Einfluss von synthetischem VIRIP auf die Infektion von CEMx174-SEAP Indikatorzellen (links) und die Replikation in humanen PBMCs (rechts). Die Zellen wurden in Gegenwart der aufgeführten Mengen an VIRIP infiziert und kultiviert. Zur Bestimmung des viralen Eintritts wurde die Aktivität der sekretierten Alkalinen Phosphatase in Kulturüberstand der CEMx174-SEAP Zellen drei Tage nach der Infektion bestimmt.

Figur 3: Die V3-Schleife des X4-tropen NL43 Klon wurde gegen die entsprechenden Sequenzen der dargestellten HIV-1 Isolate ausgetauscht. Die rekombinanten Viren unterscheiden sich somit ausschließlich in der V3-Schleife. Im rechten Panel ist der beobachtete inhibitorische Effekt (%), die Gesamtladung der V3-Region und der Korezeptortropismus dargestellt.

Figur 4: Dosis-abhängige Hemmung der X4-tropen P59S und der R5-tropen 92TH HIV-1 NL4-3 Rekombinanten durch VIRIP. P4R5

Indikatorzellen wurden in Gegenwart der dargestellten Konzentrationen an VIRIP infiziert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Zellextrakt 2 Tage nach Infektion gemessen.

Figur 5: VIRIP hemmt die Vermehrung verschiedener HIV-Isolate mit unterschiedlichem Zell- und Korezeptor-Tropismus in humanen PBMC. Vorstimulierte PBMC wurden in Gegenwart der dargestellten VIRIP Konzentrationen mit den diversen HIV-1 Isolaten (10 ng p27 antigen) oder einem chimären Onko-Lentivirus (Mu-HIV). Die Virusvermehrung wurde durch die Messung der Reverse Transkriptase-Aktivität im Zellkulturüberstand bestimmt.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben.

### **Beispiel 1**

#### **Isolierung des antiviral wirksamen VIRIP**

##### 1. Schritt: Hämofiltrat-Batch-Extraktion

800-1000 L Hämofiltrat werden mit HCl auf einen pH -Wert von 2.7 eingestellt und mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 5.5 mS/cm verdünnt und mit einer Flussrate von 3 L/min auf einen starken Kationenaustauscher aufgetragen.

##### *Chromatographiebedingungen:*

Säule:	Vantage VA 250 (Amicon, Witten)
Säulenmaterial:	Fractogel TSK SP 650 (M) , 25 cm x 20 cm
Fluss:	3 L/min
Detektion:	280 nm, pH, Leitfähigkeit
Puffer A:	Hämofiltrat pH 2.7, Leitfähigkeit 5.5 mS/cm
Puffer B:	0.5 M Ammoniumacetat



Anlage: Autopilot Chromatographiesystem, (PerSeptive Bio systems, Wiesbaden)

Nach Auftrag der insgesamt 1.000 L Flüssigkeit über Nacht wird mit mehreren Säulenvolumina 5 mM HCl gespült. Die Elution der gebundenen Peptide erfolgt als Batch-Elution mit 0.5 M Ammoniumacetat. Hierbei wird eine komplette Elution der Peptide über steigenden pH-Wert (6.8 - 7.2) und steigende Leitfähigkeit (56 mS/cm) in etwa 5 L Eluat erreicht.

## 2. Schritt: Erste präparative Auftrennung (Charge 01/1998)

Die Ammoniumacetat-Eluate der Batch-Extraktion werden in einer Menge von 10.000 L Hämofiltrat-Peptid vereinigt. Nach pH-Einstellung auf 2.7 wird das Peptidextrakt unter Zumischung von VE-Wasser mit einer Leitfähigkeit von 5.5 mS/cm auf den präparativen Kationenaustauscher aufgetragen.

### *Chromatographiebedingungen:*

Säule: Vantage 250 VA  
 Säulenmaterial: Fractogel TSK SP 650 (M) , 25 cm x 20 cm  
 Fluss: bis zu 3 L/min während des Auftrages  
 0.5 bis 1 L während der Elution  
 Detektion: 280 nm, pH, Leitfähigkeit  
 Probe: Hämofiltrat pH 2.7, Leitfähigkeit 5.5 mS/cm  
 Anlage: Autopilot Chromatographiesystem, (PerSeptive Bio systems, Wiesbaden)

Nach Auftrag des Rohextraktes über 240 min wird die Säule mit 0.01 M HCl gespült, bis die Leitfähigkeit unter 1 mS/cm ist. Die Elution erfolgt dabei in mehreren Stufen mit den im folgenden angegebenen Puffern

Puffer	pH-Wert	Puffersubstanzen	Leitfähigkeit (mS/cm)
Waschpuffer:	2.0	0.01 M HCl	1

8

Elutionspuffer 1:	3.6	0.1 M Zitronensäure-1-hydrat	2.9
Elutionspuffer 2:	4.5	0.1 M Essigsäure + 0.1 M Natriumacetat	4.0
Elutionspuffer 3:	5.0	0.1 M Äpfelsäure	6.2
Elutionspuffer 4:	5.6	0.1 M Bernsteinsäure	6.1
Elutionspuffer 5:	6.6	0.1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.9
Elutionspuffer 6:	7.4	0.1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.7
Elutionspuffer 7:	9.0	0.1 M Ammoniumcarbonat	6.7

Die Eluate 1-7 werden als pH-Pool I-VII bezeichnet (s. Fig. 1a). Sie werden separat gesammelt und abschließend mit VE-Wasser gespült. Die Elution erfolgt bis zum Erreichen einer neuen Basislinie, wobei für die einzelnen pH-Pools I bis VII Elutionsvolumina von 10 bis 25 L erreicht werden.

### 3. Schritt: Zweite präparative Auftrennung:

Die einzelnen pH-Pools werden zur Fraktionierung und gleichzeitigen Entsalzung über eine Reversed Phase Chromatographie getrennt

#### *Chromatographiebedingungen:*

Säule:	FineLine 100 (Pharmacia, Freiburg)
Säulenmaterial:	Source RPC, 15 µm
	10 x 12.5 cm (FineLine 100)
Fluss:	150 mL/min (FineLine 100)
Detektion:	280 nm, Leitfähigkeit, pH
Puffer A:	10 mM HCl
Puffer B:	80% Acetonitril in 10 mM HCl
Gradient:	0-60% Puffer B in 5 Säulenvolumen

Nach Auftrag der einzelnen pH-Pools wird die Säule mit Puffer A gespült. Während der Elution werden Fraktionen zu 200 ml gesammelt. Die Fraktionen werden gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert. Aliquots der entstandenen

Fraktionen werden im Bioassay getestet. Die Fraktion 20 aus pH-Pool I enthielt das erfindungsgemäße Peptid (s. Fig. 1b, c).

#### 4. Schritt: Semipräparative Reverse-Phase C18-Chromatographie:

Insgesamt 500 mg der im Assay bioaktiven Fraktion 20 aus pH-Pool I wurden über eine semipräparative Reverse-Phase Säule aufgetrennt. Die Fraktion 27 enthielt die erfindungsgemäße Substanz (s. Fig. 1d).

##### *Chromatographiebedingungen:*

Säule:	4,7 cm x 30 cm Stahlsäule
Füllmaterial:	Vydac RP-C18 15-20 µm, 300 Å
Puffer A:	30% Methanol, 70% Wasser, 0.1% TFA
Puffer B:	100% Methanol, 0.1% TFA
Gradient:	0 - 60% B in 2100 ml
Fluss:	40 ml/min
Detektion:	214 nm und 280 nm
Chromatographieranlage:	BioCad 250, Perseptive Biosystems
Fraktionen:	à 50 ml ab Start des Gradienten

#### 5. Schritt: Analytische Reverse-Phase C4-Chromatographie:

Die bioaktive Fraktion 27 aus der vorhergehenden Chromatographie wurde über eine analytische Reverse-Phase Säule aufgetrennt. Aliquots wurden im Bioassay getestet. Die Fraktionen 33+34 enthielten die erfindungsgemäße Substanz in aufgereinigter Form.

##### *Chromatographiebedingungen: 5 µm, 100 Å, 20 x 250 mm;*

Säule:	2 cm x 25 cm Stahlsäule
Füllmaterial:	RP-C4, 5 µm, 100 Å, Biotek Silica, Östringen,

Germany

Puffer A: Wasser, 0.1 % TFA  
Puffer B: 80 % Acetonitril, 20% Wasser, 0.1 % TFA,  
Gradient: 20 - 60% B in 80 min, 60 - 100% B in 2 min  
Fluss: 8 ml/min  
Detektion: 214 nm und 280 nm  
Chromatographieanlage: Kontron  
Fraktionen: á 1.5 min ab Start des Gradienten

Die erfindungsgemäße Reinsubstanz wurde daraufhin in dosisabhängiger Weise im Bioassay untersucht und peptidchemisch charakterisiert.

## Beispiel 2

### Massenbestimmungen

Die Massenbestimmungen des aus Hämofiltrat isolierten Peptids (aus den Fraktionen 33+34 des 5. Schritts in Beispiel 1) und des chemisch synthetisierten Peptids (Beispiel 3) wurden auf einem ESI Massenspektrometer durchgeführt (s. Fig. 1f). Die Molekülmasse der Peptide wurden entsprechend der nachfolgend gezeigten Massenzahlen (MW) bestimmt:

VIRIP, isoliert aus humanem Hämofiltrat: 2303 Da

VIRIP, chemisch synthetisiertes Peptid: 2303 Da

### Sequenzbestimmung

Die aufgereinigten nativen und chemisch synthetisierten Peptide werden mittels Edman-Abbau auf einem ABI 473 A Sequenzer unter Verwendung des Standard-Programms analysiert. Die Proben werden auf eine Polybrene-Membran in Mengen zwischen 100 und 400 pmol aufgetragen. Es ergaben sich sowohl für das aus Hämofiltrat isolierte Peptid (aus den Fraktionen 33+34 des

5. Schritts in Beispiel 1) und das chemisch synthetisierte Peptid (Beispiel 3) folgende identische vollständige Aminosäuresequenz:

LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF

#### Datenbankvergleich

Ein Datenbankvergleich wurde mit Hilfe des HUSAR-Programmpakets an den SwissProt und EMBL-Nukleinsäure Datenbanken durchgeführt. Die Peptidsequenz besitzt eine hundertprozentige Identität zu dem aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuren 353-372 des humanen Proteins Alpha-1-Antitrypsin (Accession No. P01009).

### **Beispiel 3**

#### **Chemische Synthese von VIRIP**

Die chemische Synthese von VIRIP wurde mittels konventioneller Festphasensynthese auf einem Peptid-Synthesizer 9050 unter Verwendung der bekannten Fmoc-Chemie durchgeführt. Das erhaltene Peptid wurde über Reverse-Phase Chromatographie aufgereinigt, seine Identität und Reinheit wurde mittels analytischer RP-HPLC sowie der unter Beispiel 2 beschriebenen Massen- und Sequenzbestimmung festgestellt.

### **Beispiel 4**

#### **Bestimmung der antiviralen Aktivität von VIRIP**

Die Isolierung der VIRIP erfolgte aufgrund ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Vermehrung von HIV-1 in einem Assay, der die Replikation von HIV-1 in peripheren humanen Blutlymphozyten (PBMCs) misst. Dazu wurden jeweils Aliquots der unter Beispiel 1 beschriebenen einzelnen Chromatographiestufen

gefriergetrocknet und anschließend dem biologischen Assay in Mengen von 10 ml bis zu 1 L Hämofiltrat-Äquivalent zugeführt. Die Fraktionen, die jeweils ein positives Signal ergaben, wurden der weiteren Aufreinigung unterzogen.

Humane periphere Blutlymphozyten (PBMCs) wurden aus Vollblut mittels Dichtegradienten-Zentrifugation in Ficoll gewonnen. Die Zellen wurden für zwei Tage vorstimuliert (RPMI-Medium, 20% FKS, 100 U/ml IL-2, 5 µg/ml Phytohämagglutinin [PHA]). Anschließend wurden die PBMCs durch Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm sedimentiert, in PHA-freiem RPMI-Medium aufgenommen (20% FKS, 100 U/ml IL-2) und in einer Konzentration von etwa 150.000 Zellen pro Loch in 96-Well-Flachboden-Platten in einem Volumen von 80 µl ausgesät.

Am folgenden Tag wurden Aliquots der unter Beispiel 1 beschriebenen einzelnen Chromatographiestufen in Mengen von 10 ml bis zu 1 L Hämofiltrat-Äquivalent zugeführt. Dazu wurden die gefriergetrockneten Chromatographiestufen in Wasser aufgenommen und in verschiedenen Konzentrationen in einem Gesamtvolumen von 10 µl zu den PBMCs pipettiert. Nach 2stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch die Zugabe von 10 µl HIV-1 Virusstock, der 0,1 bis 10 ng p24 Antigen enthält, infiziert. Im folgenden wurden 50 µl des Kulturmediums alle 2 Tage durch frisches Medium ersetzt, welches zusätzlich die korrespondierenden Peptid-Fraktionen enthält. Die Produktion an HIV-Partikeln zu verschiedenen Zeitpunkten (9, 12 und 18 Tage) nach der Infektion der Zellen wurde im Reverse-Transkriptase(RT)-Test quantifiziert. Der RT-Test misst die Aktivität der Reversen-Transkriptase im zellfreien Kulturüberstand und ist somit ein Maß für die Produktion an Viruspartikeln und die virale Vermehrung in den PBMC-Kulturen. Alternativ wurde die Virusproduktion im p24 Antigen-ELISA bestimmt. Fraktionen, die im Vergleich zu Ansätzen ohne potentiell stimulierende oder inhibitorische Peptide zu einer mindestens 90%igen Reduktion der RT-Produktion führten (s. z.B. Fig. 1b) und somit die Vermehrung von HIV-1 in humanen PBMC effizient hemmten, wurden weiter aufgereinigt.

Das aus Hämofiltrat aufgereinigte VIRIP (Beispiel 1) als auch das chemisch synthetisierte VIRIP (Beispiel 3) zeigten eine dosisabhängige Inhibition der HIV-1 Infektion von CEMx174-SEAP Indikatorzellen und der Replikation in PBMCs (Fig. 2). Das erfindungsgemäße VIRIP besitzt dagegen keine zytotoxische Wirkung auf die Blutzellen.

**Beispiel 5. Die Effizienz der VIRIP-spezifischen Inhibition ist abhängig von der Sequenz der V3-Schleife im HIV-1 Hüllprotein.**

Die Ergebnisse belegten, dass sowohl VIRIP aus Hämofiltrat, als auch das synthetisch hergestellte Peptid die Replikation von HIV-1 NL43 wirksam blockieren. Um herauszufinden, ob VIRIP spezifisch für X4-trope Varianten ist oder auch andere Formen inhibiert, welche den Korezeptor CCR5 benutzen oder dual-trop (X4/R5) sind, wurde eine Reihe von V3-Varianten des molekularen NL4-3 Klon untersucht (Fig. 3). Der V3-Loop des X4-tropen NL4-3 Klon wurde durch die entsprechende Region einer Reihe von primären HIV-1 Isolatn ersetzt. Funktionelle Tests mit verschiedenen Indikatorzelllinien zeigten, dass diese V3-Rekombinanten einen unterschiedlichen Zell- und Korezeptor-Tropismus aufweisen. Um den inhibitorischen Einfluss von VIRIP auf diese Varianten zu untersuchen wurden P4R5 Indikatorzellen verwendet. P4R5-Zellen exprimieren sowohl CCR5 als auch CXCR4 und enthalten das Luziferasegen unter der Kontrolle der HIV-1 LTR. Diese Zelllinie wurde in Gegenwart und Abwesenheit von VIRIP mit den diversen rekombinanten Viren infiziert (50 ng p24) und die Infektion mit Hilfe des Luziferasetest quantifiziert. Wie in der Figur 3 dargestellt inhibierte VIRIP sowohl X4-, als auch R5- und X4/R5-trope Varianten. Insgesamt wurden jedoch X4-trope Varianten mit stark positiv geladenem V3-Loop effizienter gehemmt als R5- oder dual-trope Isolate.

Um den inhibitorischen Effekt der erfindungsgemäßen Substanz genauer zu quantifizieren, wurden P4R5 Indikator Zellen in Gegenwart verschiedener Dosen von VIRIP mit dem X4-tropen HIV-1 P59S und dem R5-tropen 92TH Isolat infiziert. Wie in der Fig. 4 dargestellt, inhibierte VIRIP das HIV-1 P59S Isolat

bei einer Konzentration von 40 µg/ml um 50%, und bei einer Konzentration von 180 µg/ml um 90%. Zur Hemmung des X-tropen 92TH Isolates waren etwa 2-fach höhere Konzentrationen an VIRIP erforderlich (Fig. 4).

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass VIRIP die Replikation von X4 - tropen und dual-tropen HIV-Varianten in humanen PBMC bei Konzentrationen von 1000 µg/ml komplett und bei Konzentrationen von 100 µg/ml zumindest partiell unterdrückt (Fig. 5, oben). Die inhibitorischen Effekte auf R5-trope Formen waren geringer. Ein chimäres Onko-Lentivirus (Mu-HIV), welches das MLV-Hüllprotein trägt, wurde nicht inhibiert (Fig. 5, unten).



### Patentansprüche

1. Peptid mit nachfolgender Aminosäuresequenz:

<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15</sup>  
<sup>16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30</sup>  
 $Z_1$ -LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF- $Z_2$  (VIRIP)

sowie seine biologisch aktiven Fragmente und/oder Varianten und/oder Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, Polyethylenglycol (PEG) modifizierte, phosphorylierte und/oder glykosylierte Derivate, sowie die durch multiple Synthese darstellbaren Peptide, welche die biologische Aktivität von VIRIP besitzen,

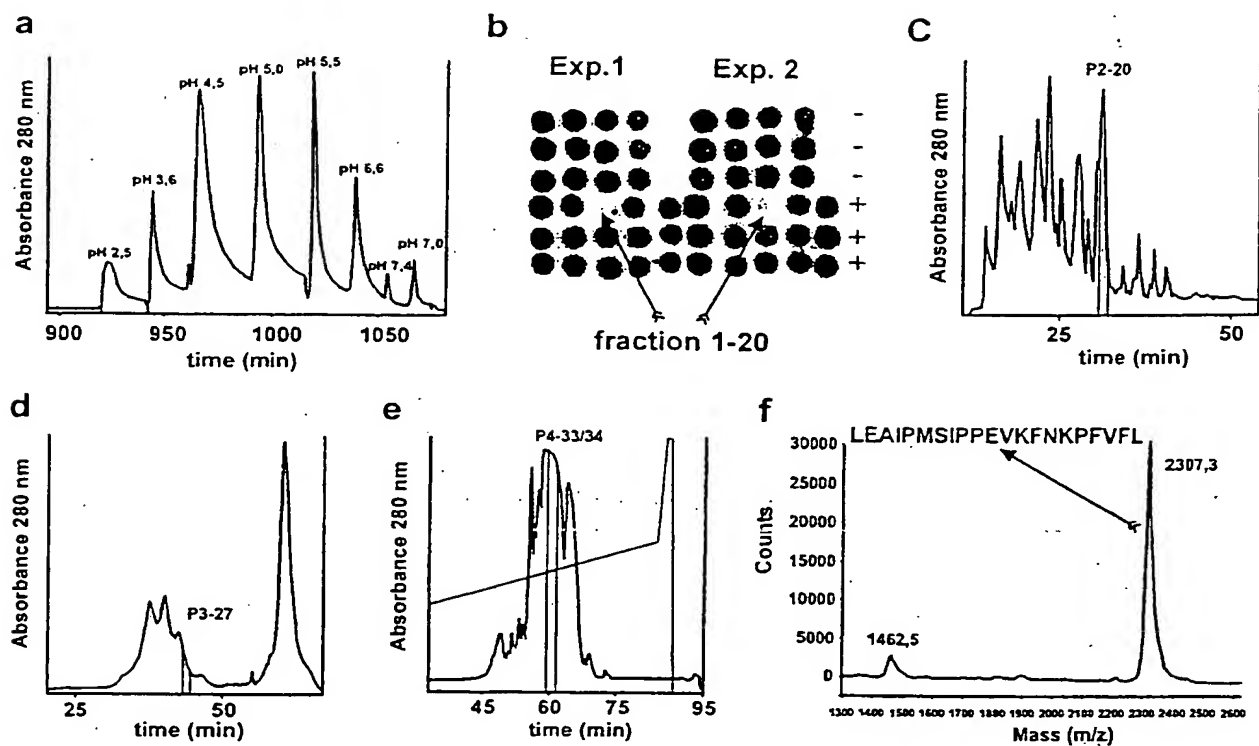
darin repräsentieren  $Z_1$ ,  $Z_2$  unabhängig voneinander eine Anzahl von 0 bis zu 10 Aminosäureresten, und falls  $Z_1$  oder  $Z_2=0$  Aminosäurereste bedeuten, dann  $Z_1=H$  und/oder  $Z_2=COOH$ .

2. Peptid VIRIP nach Anspruch 1, wobei einzelne oder mehrere Aminosäurereste in der Sequenzfolge ausgetauscht, deletiert oder zugefügt werden, sowie chemische Modifizierungen an einzelnen Aminosäuren des VIRIP, die eine verbesserte biologische Aktivität von VIRIP zur Folge haben.
3. Polynukleotide kodierend für das Peptid nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 und/oder dessen Fragmente, Varianten, Derivate und Analoga.
4. Polynukleotide nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, dass die Polynukleotide aus DNA, RNA, genomischer DNA oder PNA aufgebaut sind.
5. Vektor enthaltend die Polynukleotide aus Anspruch 3.

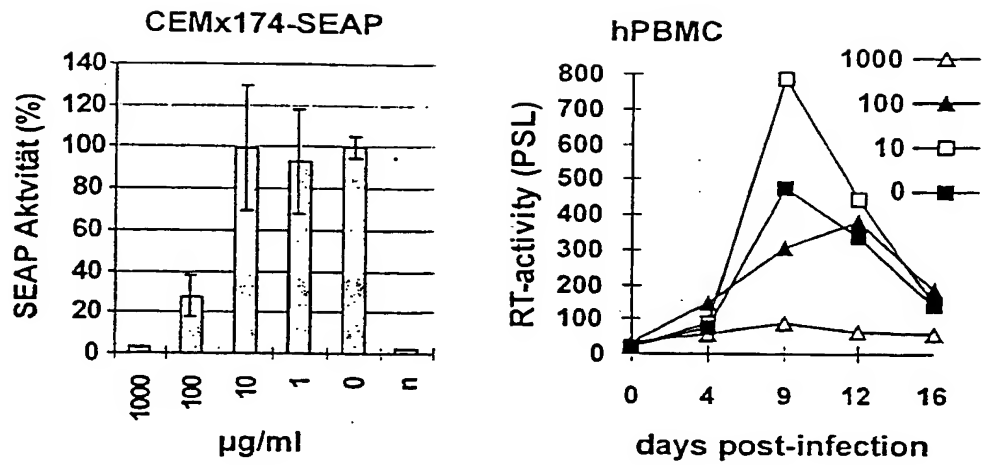
6. Gentechnisch manipulierte Wirtszelle enthaltend den Vektor nach Anspruch 5.
7. Polynukleotide hybridisierend mit einem Polynukleotid aus Anspruch 3.
8. Antikörper gerichtet gegen die Peptide aus Anspruch 1 oder 2.
9. Antagonist/Inhibitor gerichtet gegen die Peptide aus Anspruch 1 oder 2.
10. Peptide aus Anspruch 1 oder 2 in Verbindung mit einem Adapterprotein, das die Aufnahme in Virus-infizierbare Zellen gewährleistet.
11. Galenische Formulierung bestehend aus Peptiden nach Anspruch 1, 2 oder 10 und einem verträglichen Carrier.
12. Verfahren zur Herstellung des Peptides gemäß Anspruch 1 durch Extraktion von Hämofiltrat durch Kationenaustauscher-Extraktion mit nachfolgender Elution der adsorbierten Substanzen, eine erneute Kationenaustauscher-Chromatographie des die Peptide enthaltenden Extraktes sowie mehrstufige Umkehrphasen-Chromatographie.
13. Verfahren zur Herstellung des Peptides gemäß Anspruch 1 oder 2 durch Festphasensynthese im Sinne der Merrifield-Synthese sowie Flüssigphasensynthese nach dem Fachmann bekannten Methoden mit geschützten Aminosäuren und dessen Aufreinigung.

14. Verfahren zur Herstellung des Peptides gemäß Anspruch 1 oder 2 durch dem Fachmann bekannte Verfahren der heterologen Expression mittels gängiger biotechnologischer Vektoren.
15. Diagnostikmittel enthaltend Antikörper nach Anspruch 8 oder enthaltend die Polynukleotide nach Anspruch 3, 4 oder 7.
16. Verwendung des Diagnostikmittels nach Anspruch 15 für Testsysteme zur Kontrolle von Gewebe-, Plasma-, Urin- und Liquor cerebrospinalis-Spiegeln dieser Substanz.
17. Verwendung des Diagnostikmittels nach Anspruch 15 als Marker für virale Erkrankungen, bakterielle und Pilz-Infektionen, inflammatorischen und neoplastischen Prozessen sowie als Marker bei entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, Wachstumsstörungen, Erkrankungen des Immunsystems sowie als Marker bei Knochenerkrankungen.
18. Arzneimittel enthaltend die Peptide nach Anspruch 1, 2 und 10 die Polynukleotide nach Anspruch 3, 4 oder 7, die Antikörper nach Anspruch 8, die Antagonisten/Inhibitoren nach Anspruch 9 als wirksamen Bestandteil von galenischen Formen zur oralen, intravenösen, intramuskulären, intracutanen, subcutanen, intrathekalen Anwendung sowie als Aerosol zur transpulmonalen Applikation.
19. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 18 zur Behandlung von viralen Erkrankungen, dabei insbesondere HIV-1, HIV-2, Herpes-simplex-Virus, Varicella-Zoster-Virus, Hepatitis-A-, Hepatitis-B-Virus und Hepatitis-C-Virus, Zytomegalie-Virus, Influenza-Virus, Polio-Virus, Rhino-Virus, Röteln-Virus, Masern-Virus, Tollwut-Virus, Rous-Sarcom-Virus, Epstein-Barr-Virus sowie zur Behandlung von bakteriellen und Pilz-Infektionen, entzündlichen Prozessen, gestörten Entzündungsreaktionen, Tumorerkrankungen, Wachstums-

störungen, neuronalen Erkrankungen, Erkrankungen der Blutgerinnung und Blutbildung, Gefäßerkrankungen, Erkrankungen des Immunsystems, sowie zur Wund- und Knochenheilung.



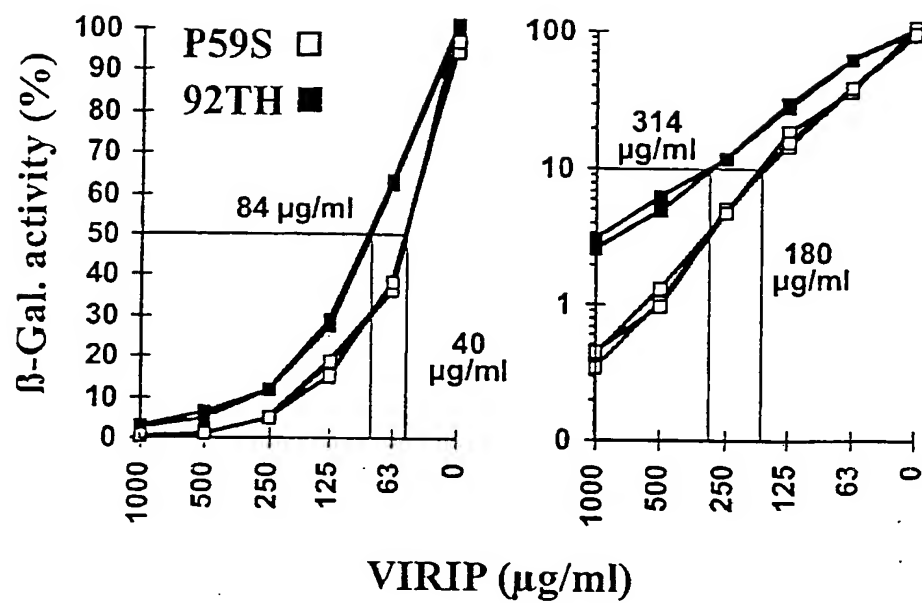
Figur 1



Figur 2

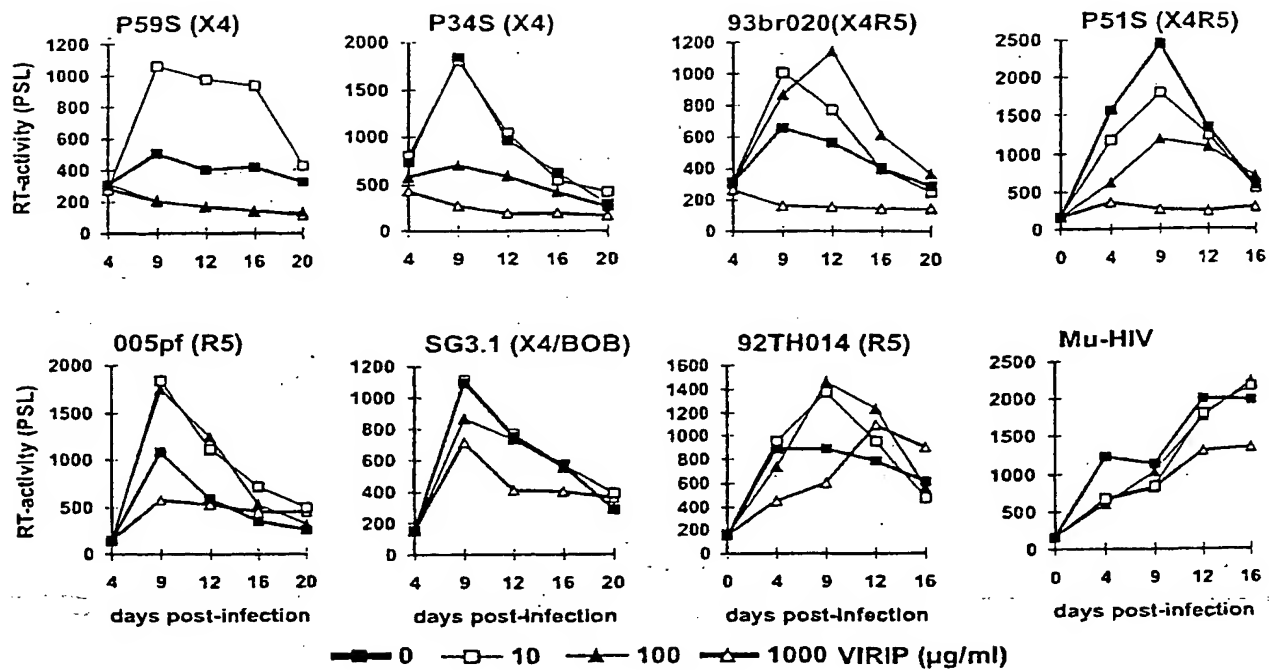
Isolat:	V3-Sequenz	%Inh.	Ldg	Trop.
P59-S/27	---- gspq-r--r- ..-----wlv yargng-----	98	+7	X4
P34-S	---- --his-r-s- ..-----ra -er-.....k ---	91	+8	X4
92ht593-1	-----s-r-s- ..-----ra -.k-...n--- ---90	+7	X4/R5	
HXB2	-----r-r- -----v- i-k-...-nm-- ---	90	+9	X4
93br020-17	-----r-sl ..----v--- a-----k ---88	+7	X4/R5	
P51-S	---- g-k--r-ms- ..-----ia -rq-.....k ---	85	+7	X4/R5
92rw020-5	-----gvr- ..---q---a --g-.....	78	+5	R5
011jr103	-----p- ..----- ..----- ---75	+6	R5	
LAI	-----r- -----i-k-...-nm-- ---	70	+8	X4
NL43	-----r- -----v- i-k-...-nm-- ---	70	+8	X4
93br025-9	-----r- ..---q---a -----58	+5	R5	
YU2	-----n- ..-----l- -----50	+5	R5	
005pf135	-----g- ..----- ..----- ---28	+5	R5	
SG3.1	---- -kk---r-tt ..---vy- ----..v-----	30	+8	X4/BOB
92th014-12	-----l ..-----w-- --q-.....22	+5	R5	
Consensus	CTRP NNNTRKSIHI QRGPGRFYT TGEI..IGDIRQ AHC			

Figur 3



Figur 4





Figur 5

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forssmann, Wolf-Georg  
Kirchhoff, Frank

<120> Humanes zirkulierendes Virus inhibirendes Peptid  
(VIRIP) und seine Verwendung

<130> VIRIP

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Ser	Ile	Pro	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Lys
1				5				10						15	

Pro	Phe	Val	Phe
			20

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
17. Mai 2001 (17.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/34640 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/11,  
15/12, C07K 7/08, 14/435, C12N 15/62, 15/63, C07K  
16/40, 1/14, 1/04, A61K 38/10, 31/7088, 39/395, A61P  
31/18

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): IPF PHARMACEUTICALS GMBH [DE/DE];  
Feodor-Lynen-Str. 31, 30625 Hannover (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/11020

(71) Anmelder und  
(72) Erfinder: KIRCHHOFF, Frank [DE/DE]; Schlossgarten  
4, 91054 Erlangen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
8. November 2000 (08.11.2000)

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜNCH, Jan

(25) Einreichungssprache: Deutsch

[DE/DE]; Schlossgarten 4, 91054 Erlangen (DE).  
STÄNDKER, Ludger [DE/DE]; Dohmeyers Weg 25,  
30625 Hannover (DE). FORSSMANN, Wolf-Georg IPF  
PharmaCeuticals GmbH [DE/DE]; Feodor-Lynen-Str.  
31, 30625 Hannover (DE). ADERMANN, Knut IPF  
PharmaCeuticals GmbH [DE/DE]; Feodor-Lynen-Str.  
31, 30625 Hannover (DE).

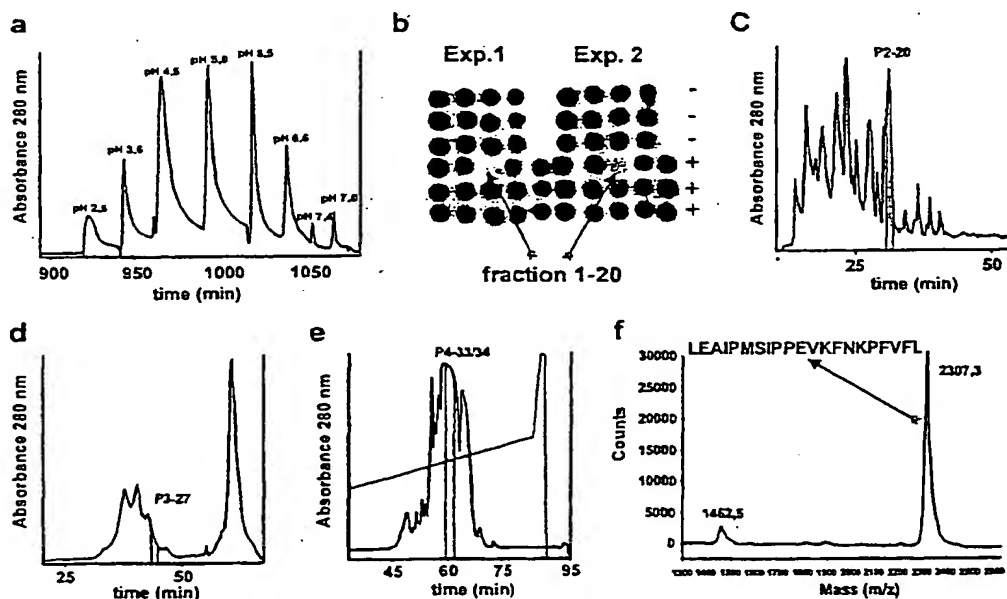
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 53 732.1 8. November 1999 (08.11.1999) DE  
100 23 665.0 16. Mai 2000 (16.05.2000) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PEPTIDE (VIRIP) WHICH INHIBITS A CIRCULATING VIRUS IN HUMANS AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: HUMANES ZIRKULIERENDES VIRUS INHIBIERENDES PEPTID (VIRIP) UND SEINE VERWENDUNG



(57) Abstract: The invention relates to a peptide with the following amino acid sequence: Z<sub>1</sub>-LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF-Z<sub>2</sub> (VIRIP), in addition to its biologically active fragments and/or variants and/or derivatives, in particular, amidated, acetylated, sulfated, polyethylene glycol (PEG) modified, phosphorylated and/or glycosylated derivatives and to peptides which can be prepared by multiple synthesis and which have the biological activity of VIRIP. In said sequence, Z<sub>1</sub> and Z<sub>2</sub> represent independently of one another a number of amino acid esters between 0 and 10 and if Z<sub>1</sub> or Z<sub>2</sub>=0 amino acid esters, then Z<sub>1</sub>=H and/or Z<sub>2</sub>=COOH.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/34640 A3



(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.: Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).

ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

1. November 2001

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Peptid mit nachfolgender Aminosäuresequenz: Z<sub>1</sub>-LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF-Z<sub>2</sub> (VIRIP), sowie seine biologisch aktiven Fragmente und/oder Varianten und/oder Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, Polyethylenglycol (PEG) modifizierte, phosphorylierte und/oder glykosylierte Derivate, sowie die durch multiple Synthese darstellbaren Peptide, welche die biologische Aktivität von VIRIP besitzen, darin repräsentieren Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub> unabhängig voneinander eine Anzahl von 0 bis zu 10 Aminosäureresten, und falls Z<sub>1</sub> oder Z<sub>2</sub>=0 Aminosäurereste bedeuten, dann Z<sub>1</sub>=H und/oder Z<sub>2</sub>=COOH.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/11020

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/11 C12N15/12 C07K7/08 C07K14/435 C12N15/62 C12N15/63 C07K16/40 C07K1/14 C07K1/04 A61K38/10 A61K31/7088 A61K39/395 A61P31/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 46100 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 11 December 1997 (1997-12-11) SEQ ID NO:31	1-8
A	---	10-19
X	WO 84 02918 A (TRANSGENE SA) 2 August 1984 (1984-08-02) page 36, line 6	3-8
X	-& DATABASE GENBANK 'Online! Accession No. A35541, 13 December 1996 (1996-12-13) "H. sapiens alpha-AT1 partial cDNA clone" XP002164956 the whole document	3
A	US 5 420 110 A (MILLER EDWARD J) 30 May 1995 (1995-05-30) column 2, line 20,21	1-8, 10-19
	--- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  9 April 2001		Date of mailing of the international search report  18.05.01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Herrmann, K

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
PCT/EP 00/11020

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>SHAPIRO LELAND ET AL:                      "Alpha-1-antitrypsin inhibits human                      immunodeficiency virus type 1."                      FASEB JOURNAL,                      vol. 15, no. 1, January 2001 (2001-01),                      pages 115-122, XP002164955                      ISSN: 0892-6638                      the whole document</p>	<p>1-8,                      10-19</p>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00 /11020

**Box I** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
See supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: Claims nos: 9 and in part 18  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
See supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II** Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**See next page**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

## FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

## Continuation of field I.1

Although the claims nos. 16, 17 and 19 relate to a diagnostic method carried out on the human/animal body, or relate to a method for the treatment of the human/animal body, a search was carried out and was based on the indicated effects of the compound/composition.

In the broadest sense, claim no. 6 also covers transgenic human beings (and is not restricted to 'non-human' host cell or 'in vitro'). This contravenes the ethics in certain PCT Member States e.g. Article 53(a) of the European Patent Agreement).

## Continuation of field I.2

## Claims nos: 9 and in part 18

Compounds as such are not sufficiently defined by the details of their effects. A search was not therefore carried out for the subject matter of claims 9 and in part 18 (antagonists/inhibitors), as an antagonist/inhibitor is neither disclosed nor supported by the description according to the terms of PCT Articles 5 and 6.

The applicant is therefore advised that patent claims, or sections of patent claims relating to inventions for which no international search report was drafted, cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination of subject matter, for which no search has been conducted. This is also the case, irrespective of whether the claims are amended following receipt of the international search report (PCT Article 19) or during any PCT Chapter II procedure whereby the applicant submits new patent claims.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/11020

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9746100 A	11-12-1997	US 5972901 A	26-10-1999
		AU 720223 B	25-05-2000
		AU 3304497 A	05-01-1998
		EP 1006797 A	14-06-2000
		JP 2000512140 T	19-09-2000
		US 6200801 B	13-03-2001
		US 6072041 A	06-06-2000
WO 8402918 A	02-08-1984	FR 2539758 A	27-07-1984
		FR 2549082 A	18-01-1985
		AT 55150 T	15-08-1990
		CA 1303530 A	16-06-1992
		DE 3482840 D	06-09-1990
		DK 450584 A	20-09-1984
		EP 0114777 A	01-08-1984
US 5420110 A	30-05-1995	JP 60500648 T	09-05-1985
		US 5668107 A	16-09-1997
		CA 2108689 A	19-10-1992
		EP 0616614 A	28-09-1994
		JP 6509327 T	20-10-1994
		WO 9218141 A	29-10-1992

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/11020

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/11 C12N15/12 C07K7/08 C07K14/435 C12N15/62  
 C12N15/63 C07K16/40 C07K1/14 C07K1/04 A61K38/10  
 A61K31/7088 A61K39/395 A61P31/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 46100 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 11. Dezember 1997 (1997-12-11) SEQ ID NO:31	1-8
A	---	10-19
X	WO 84 02918 A (TRANSGENE SA) 2. August 1984 (1984-08-02) Seite 36, Zeile 6	3-8
X	-& DATABASE GENBANK 'Online! Accession No. A35541, 13. Dezember 1996 (1996-12-13) "H. sapiens alpha-AT1 partial cDNA clone" XP002164956 das ganze Dokument	3
A	---	
	US 5 420 110 A (MILLER EDWARD J) 30. Mai 1995 (1995-05-30) Spalte 2, Zeile 20,21	1-8, 10-19
	---	
	---/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

## \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. April 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18. 05. 01

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Herrmann, K

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

li nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/11020

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>SHAPIRO LELAND ET AL:                      "Alpha-1-antitrypsin inhibits human                      immunodeficiency virus type 1."                      FASEB JOURNAL,                      Bd. 15, Nr. 1, Januar 2001 (2001-01),                      Seiten 115-122, XP002164955                      ISSN: 0892-6638                      das ganze Dokument</p>	<p>1-8,                      10-19</p>

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☒ Ansprüche Nr. 9 und teilweise Anspruch 18  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgetaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgetordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/SA/ 210

## Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 16, 17 und 19 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird oder Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Im weitesten Sinn umfasst Anspruch 6 auch transgene Menschen (nicht auf "nicht-humane" Wirtszelle bzw. "in vitro" beschränkt). Dieser Gegenstand verstößt gegen die guten Sitten in bestimmten PCT-Mitgliedsstaaten (z.B. Art. 53(a) des EPÜ).

## Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 9 und teilweise Anspruch 18

Verbindungen als solche sind durch die Angabe ihrer Wirkung nicht ausreichend definiert. Daher wurde der Gegenstand des Anspruchs 9 und teilweise des Anspruchs 18 (Antagonisten/Inhibitoren) nicht recherchiert weil ein Antagonist/Inhibitor, im Sinne der Art. 5 und 6 PCT, weder offenbart noch durch die Beschreibung gestützt ist.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

II. Nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/11020

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9746100 A	11-12-1997	US 5972901 A	26-10-1999
		AU 720223 B	25-05-2000
		AU 3304497 A	05-01-1998
		EP 1006797 A	14-06-2000
		JP 2000512140 T	19-09-2000
		US 6200801 B	13-03-2001
		US 6072041 A	06-06-2000
WO 8402918 A	02-08-1984	FR 2539758 A	27-07-1984
		FR 2549082 A	18-01-1985
		AT 55150 T	15-08-1990
		CA 1303530 A	16-06-1992
		DE 3482840 D	06-09-1990
		DK 450584 A	20-09-1984
		EP 0114777 A	01-08-1984
		JP 60500648 T	09-05-1985
US 5420110 A	30-05-1995	US 5668107 A	16-09-1997
		CA 2108689 A	19-10-1992
		EP 0616614 A	28-09-1994
		JP 6509327 T	20-10-1994
		WO 9218141 A	29-10-1992

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)